

A dapoxetin gyógyszerkémiái jellemzése, ciklodextrin-komplexeinek egyensúlyi és szerkezeti vizsgálata

Doktori tézisek

Darcsi András

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



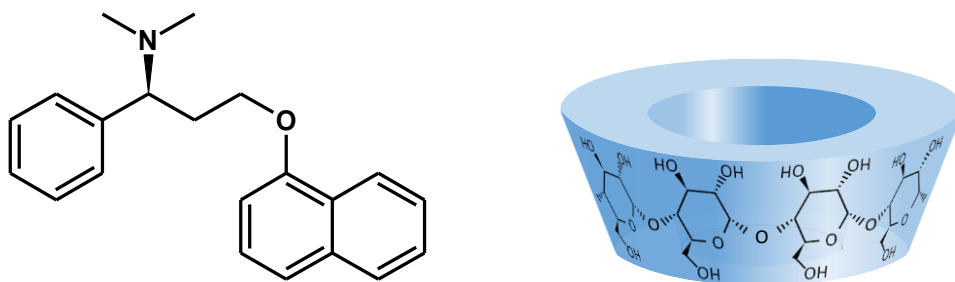
Témavezető:	Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens
Hivatalos bírálók:	Dr. Tétényi Péter, Ph.D., egyetemi adjunktus Dr. Tircsó Gyula, Ph.D., egyetemi adjunktus
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Perjési Pál, C.Sc., egyetemi tanár Dr. Krajsovsky Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

1 Bevezetés

A 1990-es évek végén a szexuális zavarok hatékony gyógyszeres terápiájában elsőként az erektilis diszfunkció kezelésére használt foszfodiészteráz-5 (PDE-5) enzim gátlókat törzskönyvezték. A korai magömlés az erektilis diszfunkció mellett a leggyakoribb szexuális rendellenesség, ami egyes becslések szerint a férfiak 30%-át érinti világszerte. Magas gyakorisága és a férfiak életminőségére kifejtett kedvezőtlen hatása ellenére csak az utóbbi időben fordítottak kellő figyelmet a megfelelő terápiás stratégiák kidolgozására. A kezelés főbb gyógyszerei a helyi érzéstelenítők (lidokain, benzokain), a szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI), az opioid fájdalomcsillapítók (tramadol), a PDE-5 gátlók és az alfa-adrenerg receptor blokkolók közül kerültek ki.

A dapoxetin (Dpx) az első SSRI hatóanyag, amelyet specifikusan a korai magömlés kezelésére fejlesztettek ki. 2009-ben törzskönyvezték, jelenleg a világ több mint 40 országában elérhető, 2013-óta Magyarországon is forgalomban van az eutomer (*S*)-dapoxetin Priligy® néven (1. ábra).



1. ábra. A (*S*)-dapoxetin bázis és a natív ciklodextrinek sematikus szerkezete

Tekintettel arra, hogy a dapoxetin még egyik gyógyszerkönyvben sem hivatalos és generikus gyártása csak a 2020-as években várható, kevés adattal rendelkezünk a hatóanyag kémiai és analitikai tulajdonságairól. Doktori munkám ezen új hatóanyag gyógyszerkémiai és ciklodextrin-komplexeinek analitikai jellemzésével foglalkozik.

2 Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a Dpx kémiai és analitikai jellemzését különös tekintettel a hatóanyag szintézisének, bomlási tulajdonságainak illetve ciklodextrinekkel kialakított kölcsönhatásainak a vizsgálatára.

Célként fogalmaztuk meg a Dpx szintézise során keletkező melléktermék izolálását, szerkezetmeghatározását és képződésének kémiai magyarázatát.

További célunk volt a Dpx ezidáig alig tanulmányozott bomlásának vizsgálata, a bomlástermékek szerkezetmeghatározása, illetve keletkezésük magyarázata.

Végül célunk volt a Dpx natív ciklodextrinekkel (CD) kialakított komplexeinek részletes tanulmányozása ortogonális analitikai technikák (NMR, cirkuláris dikroizmus/UV spektroszkópia, tömegspektrometria és fázis-oldhatósági vizsgálatok) segítségével.

Ezen eredmények felhasználásával terveztük egy új, izomertiszta per-karboximetil- γ -CD-származék (ODMCM- γ -CD) pH-függő komplexképzésének és királis elválasztóképességének vizsgálatát NMR és kapilláris zónaelektroforézissel, a Dpx és aktív metabolitjainak modellvegyületként történő felhasználásával.

3 Módszerek

3.1 Fázis-oldhatóság vizsgálatok

A β -, γ - és RAME- γ -CD Dpx bázisra kifejtett oldhatóságnövelő hatását Higuchi és Connors módszerével vizsgáltuk. A mérésekhez 7,4-es pH-jú foszfát puffert használtunk. Feleslegben vett Dpx (1,5 mg) különböző CD koncentrációjú (1-50 mM-ig, kivéve a β -CD: 0-10 mM) 1,0 ml-es szuszpenzióit $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on rázattuk. Az egyensúly beállta után a mintákat centrifugáltuk, majd a Dpx koncentrációját 291 nm-en spektrofotometriásan határoztuk meg Jasco-V550 készüléken.

3.2 Tömegspektrometriás mérések

Az MS méréseket Agilent 1260 Infinity HPLC rendszerhez kapcsolt, repülési idő analizátorral rendelkező (TOF) spektrométeren végeztük, elektropray ionizációt (ESI) alkalmazva, pozitív ionizációs mód alkalmazásával. Izokratikus mozgófázist alkalmaztunk, mely 0,1 % vizes hangyasavoldatot és szerves fázisként metanolt vagy acetonitrilt tartalmazott, legalább 50:50 % arányban 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. A mérés során a tömegkalibrációhoz 121.050873 és 922.009798 m/z közötti tartományban lévő referenciatömegeket használtunk. A tömegspektrumok kiértékelését Agilent MassHunter B.02.00 szoftverrel végeztük el.

3.3 NMR mérések és kiértékelésük

Az NMR mérések többségét a Semmelweis Egyetem 600 MHz-es Varian DDR NMR spektrométerén (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A mintákat deuterált oldószerekben oldottuk és 5 mm átmérőjű standard NMR csövekbe helyeztük. Az adatgyűjtés VnmrJ 3.2C szoftverrel történt, a ChemPack 5.1-ben szereplő standard pulzusprogramok használatával. Az előállított vegyületek, valamint a Dpx és a CD komplexek teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelését (teljes asszignáció esetén) egy- és kétdimenziós homo- és heteronukleáris kísérletek (1D ^1H , ^{13}C , 1D TOCSY, ^1H – ^1H gCOSY, zTOCSY, ^1H – ^{13}C gHSQCAD ($^1J_{\text{CH}} = 140 \text{ Hz}$), ^1H – ^{13}C gHMBCAD ($^nJ_{\text{CH}} = 8 \text{ Hz}$)) alapján végeztük el. Az ^1H és ^{13}C kémiai eltolódás skálát TMS belső standardot tartalmazó oldószer esetén 0,00 ppm-re, illetve a CDCl_3 és CD_3OD (TMS mentes) oldószerek esetén az ^1H kémiai eltolódás skálát a nyomokban jelenlévő CHCl_3 -ra (^1H : 7,21 ppm) és CHD_2OD multipllettjére (^1H : 3,34 ppm), míg a ^{13}C skálát a megfelelő oldószer ^{13}C jelére (CDCl_3 , ^{13}C : 77,16 ppm; CD_3OD , ^{13}C : 49,00 ppm-re) kalibráltuk. A CD-kel DSS mentes D_2O -ban végzett titrálásoknál MeOH -t használtunk referenciaként (3,32 ppm).

3.3.1 Sztöchiometria meghatározása

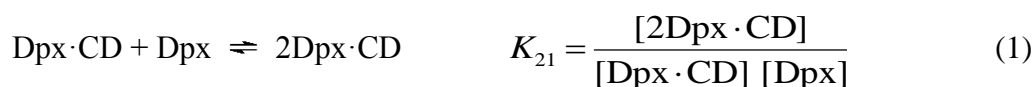
A Dpx β -, és γ -CD-kel képzett komplexeinek sztöchiometriáját Job-módszere szerinti ^1H NMR titrálással határoztuk meg. A két komponens teljes moláris koncentrációját állandó, $c_{\text{CD}} + c_{\text{Dpx}} = 3 \text{ mM}$ -os értéken tartottuk, de a Dpx móltörtjét $x_{\text{Dpx}} = c_{\text{Dpx}} / (c_{\text{Dpx}} + c_{\text{CD}})$ folyamatosan változtattuk 0,1 egységnyi lépésekkel 0,0-tól 1,0 értékig. Néhány, jól követhető Dpx ^1H jelének kémiai eltolódását $\delta^{\text{Dpx}, i}$ leolvastuk, és a szabad komponens kémiai eltolódásához δ_{Dpx}^i képest e magok komplexképzés során mutatott monoton elmozdulásából $\Delta\delta^{\text{Dpx}, i} = \delta^{\text{Dpx}, i} - \delta_{\text{Dpx}}^i$ kiszámítottuk a kémiai eltolódásváltozásuk abszolút értékét $|\Delta\delta^{\text{Dpx}, i}|$, melyet a Job függvények megszerkesztéséhez használtunk fel. Hasonló módon számítottuk, és ábrázoltuk a CD-k néhány választott protonját is.

3.3.2 ^1H NMR titrálások

A titrálást a Job módszer esetén alkalmazott körülményekhez hasonlóan (10 mM CD_3COOD oldat NaOD -dal $\text{pH}^* 5,2$ -re állított pufferoldatban, 25°C -on), a c_{Dpx} -t állandó értéken tartva növekvő CD koncentráció alkalmazásával valósítottuk meg. Az oldatok elkészítése során 1 mM-os Dpx törzsoldatban oldottuk az analitikai pontossággal kimért CD-ket (β -CD: 0,1-től

12,0 mM-ig; γ -CD: 0,1-től 25,0 mM-ig), majd NMR csövekbe juttattuk és az egyensúly beálltáig 24 órán át állni hagytuk az ^1H NMR méréseket megelőzően.

A Job-mérések eredményei alapján esetünkben a számítási eljárás egy olyan összetett rendszert feltételez, ahol a $\text{Dpx} \cdot \text{CD}$ és $2\text{Dpx} \cdot \text{CD}$ részecskék együttesen vannak jelen az egyensúlyi oldatban. A $2\text{Dpx} \cdot \text{CD}$ részecskék kialakulásának második lépése az alábbi egyenlettel és K_{21} egyensúlyi állandóval jellemezhető:



A számításhoz $[\text{CD}]$ és $[\text{Dpx}]$ egyensúlyi koncentrációit minden titrálási pontban a c_{CD} és c_{Dpx} összkoncentrációkból számítottuk a tömeghatás törvénye alapján, az alábbi egyenletek szerint:

$$c_{\text{CD}} = [\text{CD}] + [\text{Dpx} \cdot \text{CD}] + [2\text{Dpx} \cdot \text{CD}] = [\text{CD}] (1 + K_{11}[\text{Dpx}] + K_{11}K_{21}[\text{Dpx}]^2) \quad (2)$$

$$c_{\text{Dpx}} = [\text{Dpx}] + [\text{Dpx} \cdot \text{CD}] + 2[2\text{Dpx} \cdot \text{CD}] = [\text{Dpx}] (1 + K_{11}[\text{CD}] + 2K_{11}K_{21}[\text{CD}][\text{Dpx}]) \quad (3)$$

Az adott magok mért kémiai eltolódása ($\delta^{\text{Dpx},i}$) minden titrálási pontban a különböző részecskék (δ_{Dpx}^i , $\delta_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^i$, $\delta_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^i$) egyedi kémiai eltolódásának móltörttekkel súlyozott átlaga:

$$\delta^{\text{Dpx},i} = \chi_{\text{Dpx}} \delta_{\text{Dpx}}^i + \chi_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}} \delta_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^i + 2\chi_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}} \delta_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^i = \frac{\delta_{\text{Dpx}}^i + [\text{CD}](\delta_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^i K_{11} + \delta_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^i 2K_{11}K_{21}[\text{Dpx}])}{1 + [\text{CD}](K_{11} + 2K_{11}K_{21}[\text{Dpx}])} \quad (4)$$

ahol χ jelöli a moláris frakciót a Dpx összkoncentrációjára vonatkozóan. A CD protonok esetén hasonló összefüggés figyelhető a j -edik CD proton kémiai eltolódása ($\delta^{\text{CD},j}$) esetén is:

$$\delta^{\text{CD},j} = \chi_{\text{CD}} \delta_{\text{CD}}^j + \chi_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}} \delta_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^j + \chi_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}} \delta_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^j = \frac{\delta_{\text{CD}}^j + \delta_{\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^j K_{11}[\text{Dpx}] + \delta_{2\text{Dpx} \cdot \text{CD}}^j K_{11}K_{21}[\text{Dpx}]^2}{1 + K_{11}[\text{Dpx}] + K_{11}K_{21}[\text{Dpx}]^2} \quad (5)$$

Az értékelést globális analízissel, mint kemometriai módszerrel végeztük el, mely többváltozós statisztikai módszerként bemeneti értéként tartalmazza a c_{Dpx} és c_{CD} teljes koncentrációját az egyes titrálási pontokban, a szabad részecskék kémiai eltolódását és a komplexképzésre leginkább érzékeny Dpx és CD protonok komplexképződés indukálta kémiai eltolódásváltozásait. Az egyensúlyi állandók meghatározása érdekében az adathalmazokat a (4) és (5) egyenletekre a legkisebb négyzetek módszerével illesztettük. Ehhez az OPIUM számítógépes programot használtuk. A legmegfelelőbb egyensúlyi modell kiválasztása számos

sztoichiometriai modell (1:1, 2:1, 1:2 stb.) vizsgálata, valamint kemometriai szempontok és kémiai megfontolások alapján történt. Az részecske-eloszlási görbék szerkesztéséhez a Hyss programot használtuk, az illesztett NMR titrálási görbéket Microsoft Excelben ábrázoltuk.

3.3.3 NOE mérések

A komplexképzés térszerkezeti viszonyainak megállapításához nukleáris Overhauser-effektuson (NOE) alapuló méréseket végeztünk. A 2D ROESY spektrumok 512 inkrementummal készültek, 0,3 s-os keverési idővel, 2,2 kHz-es spinlock alkalmazásával. Az ODMCM- γ -CD és a racém Dpx kölcsönhatását ^1H , és 2D ROESY NMR mérésekkel is vizsgáltuk. Az oldatokat a CE mérésben használt oldatokkal megegyezően pH* 2,5-re és pH* 7,0-ra állítottuk.

3.4 Cirkuláris dikroizmus és UV spektroszkópiás mérések

A cirkuláris dikroizmus és UV abszorpciós spektrumokat termosztált körülmények között ($25 \pm 0,2$ °C) JASCO J-715 spektropolariméterrel regisztráltuk. Minden spektrumot folyamatos pásztázási módban 190–350 nm-es tartományban, 100 nm/perc sebességgel, 0,2 nm-es lépésekben, 1 s-os válaszadási idővel, négyszeres spektrum akkumulációval, 1 nm sávszélességgel és 1 cm-es úthosszal rendelkező kvarc küvettában (Hellma, USA) vettünk fel. A titrálás során CD törzsoldatokat (β -CD: 15 mM; γ -CD: 70 mM) adagoltunk a Dpx vizes oldatához (1,8 ml: 23 és 30 μM). A cirkuláris dikroizmus mérése során az ellipticitást ($^{\circ}\Theta$) millifok egységekben mértük, majd átalakítottuk moláris cirkuláris dikroizmus abszorpciós együtthatóvá ($\Delta\epsilon: \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a $\Delta\epsilon = \Theta/(33982cl)$ egyenlet alapján, ahol 'c' a Dpx moláris koncentrációja és 'l' az optikai úthossz cm-ben kifejezve.

3.5 Molekulamodellezés

A számításokat a SYBYL 7.2 programmal végeztük. A kiindulási CD modellek (β -CD: 3CGT; γ -CD: 1P2G) a Brookhaven fehérje adatbázisból (PDB) származnak. A szerkezetek optimalizálásához MMFF94 erőteret használtunk. A kiindulási szerkezetek geometria-optimalizálását BFGS algoritmussal végeztük, az optimum feltételeként az energiagrádiens vektor normájának (RMS gradiens) a $< 0,01$ értéket szabtuk meg. Az optimalizált szerkezetek energiaértékei alapján a kölcsönhatási energiák számításához a legalacsonyabb energiájúakat vettük figyelembe. A grafikus megjelenítéshez UCSF Chimera szoftvert használtunk.

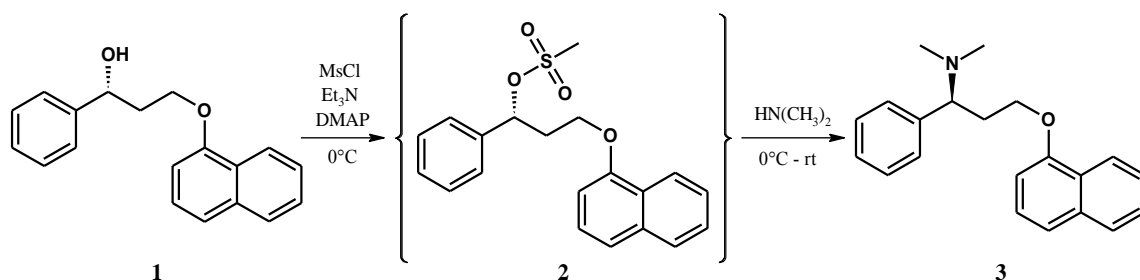
3.6 Kapilláris elektroforézis vizsgálatok

A CE méréseket diódasoros detektorral felszerelt Agilent 7000 (Agilent Technologies, Waldbornn, Németország) kapilláris elektroforézis készülékkel végeztük el, az eredmények kiértékeléséhez Chemstation szoftvert használtunk. Az elválasztáshoz kezeletlen 50 μm belső átmérőjű, 58,5 cm teljes és 50 cm effektív hosszúságú szilika kapillárist használtunk. A kapilláris hőmérsékletét 20 °C-ra állítottuk be. A mérések során 30 kV feszültséget alkalmaztunk, a jeleket 200 nm-es hullámhosszon detektáltuk. A mintákat hidrodinamikus injektálási módban (40 mbar \times 3 s) juttattuk a kapillárisba. Futtató pufferként 20 mM-os foszfát-puffereket alkalmaztunk, pH 2,5-ön és pH 7,0-en. A háttérelktrolit 1–10 mM-os koncentrációban tartalmazott ODMCM- γ -CD-t. Törzsoldatként a racém Dpx és dezmetil-metabolitjainak metanolos oldatait használtuk

4 Eredmények

4.1 A dapoxetin új gyártási szennyezője

A szakirodalomban a Dpx szintézisének utolsó lépését általában egy mezilátképzési reakción keresztül valósítják meg (2. ábra). A reakciólépés nagy előnye, hogy az *N*-dezmetil-származékok előállítására is alkalmas, hiszen ugyanazon reakciókörülmények között – dimetil-amin helyett metil-amint vagy ammóniát alkalmazva – a megfelelő dezmetil vegyületekhez juthatunk. Kezdeti célunk volt tehát a mezilát (2), mint közös intermedier izolálása, és a felvázolt reakció szerint a dezmetil-metabolitok előállítása.



2. ábra. A dapoxetin szintézisében gyakran alkalmazott utolsó reakciólépés

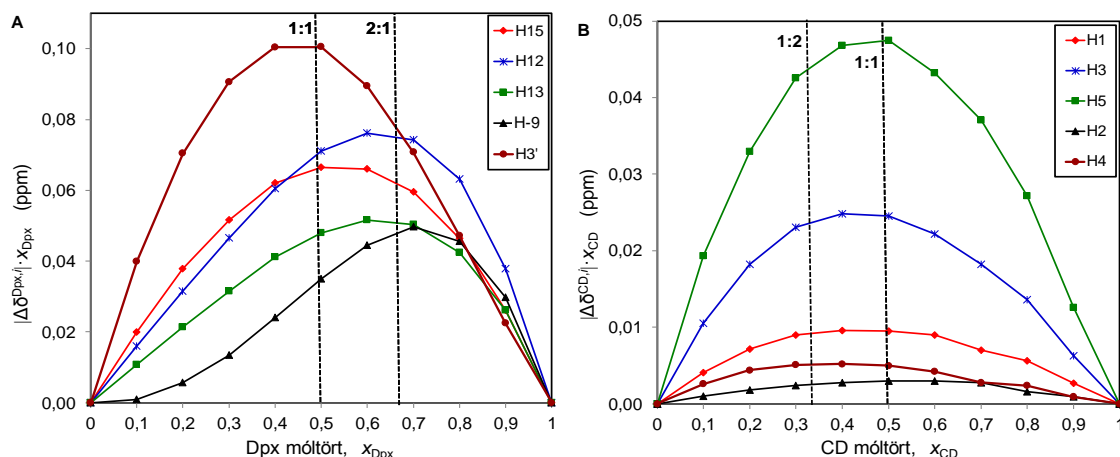
Az *in situ* keletkező mezilát rendkívül instabilnak bizonyult és izolálás során azonnal tovább alakult. Az izolált termék szerkezetét elsőként határoztuk meg repülési idő analízátoros tömegspektrométerrel (TOF-MS) és 1D és 2D NMR technikákkal, melyek egyértelműen bizonyították a 4-fenil-2*H*,3*H*,4*H*-nafto[1,2*b*]pirán keletkezését a reakció során.

4.2 A dapoxetin új bomlástermékei

A Dpx bázist néhány héten át szabad levegőn, szobahőmérsékleten tároltuk. A tisztaság ellenőrzését vékonyréteg kromatográfiás vizsgálattal végeztük el. A rétegen a Dpx foltja mellett néhány új, UV fényben jól látható bomlástermék sávja jelent meg. Az tisztítás után a bomlástermék szerkezetét TOF-MS és NMR vizsgálatok segítségével határoztuk meg. Méréseink egy elimináció során képződő 1-(2*E*)-cinnamil-oxi-naftalin (*E*-CON) keletkezését igazolták. További szelektív NMR mérés technikákkal sikerült igazolunk az ellentétes *Z* geometriai izomer jelenlétét is a bomlástermékek között.

4.3 A dapoxetin ciklodextrinekkel kialakított kölcsönhatásának jellemzése

A Dpx ciklodextrinekkel képzett zárványkomplexeinek egyensúlyi és szerkezeti jellemzését ortogonális analitikai technikák segítségével valósítottuk meg. A vizsgált CD-k esetén fázis-oldhatósági vizsgálatokból az 1:1-es sztöchiometriára következtethettünk. Tömegspektrometria méréseink az 1:2-es, {Dpx·2CD} sztöchiometriájú részecske jelenlétére utaltak. A sztöchiometria meghatározására oldatfázisú NMR méréseket végeztünk Job módszere szerint (3. ábra). Méréseink a {Dpx·CD és 2Dpx·CD} sztöchiometriával rendelkező kétféle komplexrészecskét tartalmazó rendszer kialakulását igazolták az egyensúlyi oldatban.



3. ábra. A Dpx (A) és a γ -CD (B) néhány protonjának jellegzetes Job görbéi

A kétféle sztöchiometriájú komplexrészecske együttes jelenlétét az ^1H NMR titrálási adatsorok kemometriai elemzésével is sikerült megerősítenünk. Független analitikai technikaként alkalmazott cirkuláris dikroizmussal is ezzel egybehangzó eredményekhez jutottunk. A {Dpx·CD és 2Dpx·CD} rendszert kialakulását β -CD esetén is sikerült igazolnunk. A komplexek szerkezetét NOE NMR mérésekkel igazoltuk, illetve molekulamodellezéssel egészítettük ki. A különféle technikákkal meghatározott Dpx/CD komplexek stabilitási állandóit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

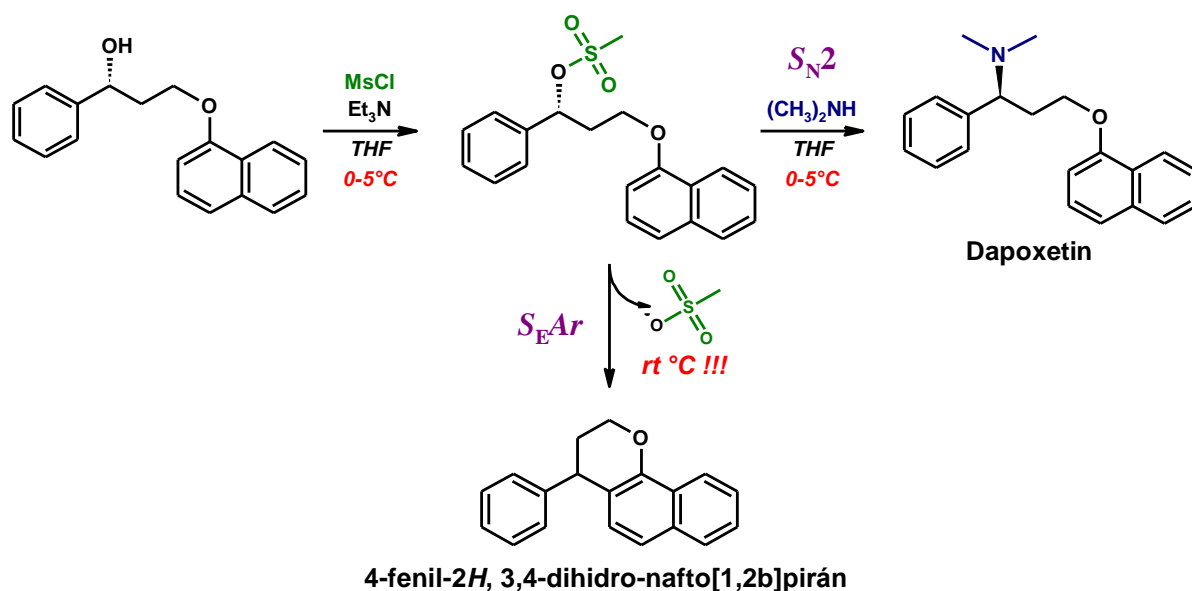
1. táblázat A Dpx/CD komplexek egyensúlyi állandóinak értékei [M^{-1} egységben], vizes oldatban 25 °C-on, különböző mérés technikák alkalmazásával

Komplex		Egyensúlyi állandók			
		Fázis-oldhatóság	^1H NMR	UV	Cirkuláris dikroizmus
Dpx· β -CD	K_{11}	886	915	–	–
2Dpx· β -CD	K_{21}	–	276	–	–
Dpx· γ -CD	K_{11}	420	661	515	595
2Dpx· γ -CD	K_{21}	–	447	–	–
Dpx·RAME- γ -CD	K_{11}	594	–	–	–

5 Következtetések

5.1 A dapoxetin új gyártási szennyezője

A mezilát intermedier előállítása kritikus lépés a hatóanyag előállítása során. Munkánk során megállapítottuk, hogy a mezilát alacsony hőmérsékleten képződik és a hőmérséklettől, valamint a nukleofil reakciópartner jelenlététől függően különböző reakciómechanizmus szerint alakul át eltérő terméket eredményezve (4. ábra).



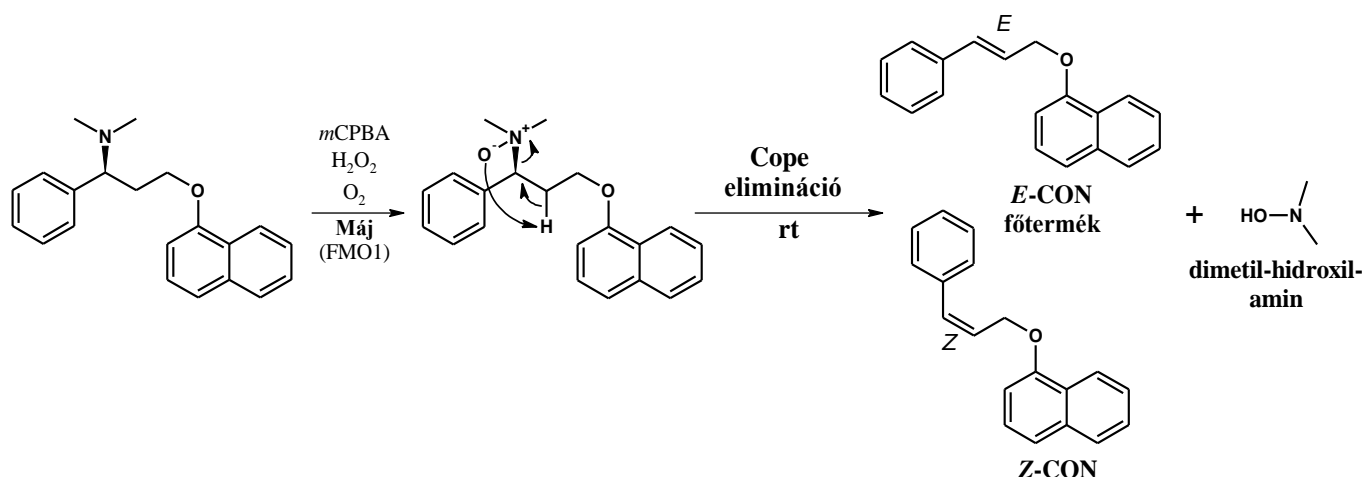
4. ábra. A hőmérséklet és a nukleofilitás szerepe a mezilát átalakulásában

Amennyiben alacsony hőmérsékletről (0–5 °C) szobahőmérsékletre emeljük a reakcióelegy hőmérsékletét, majd dimetil-aminnal, mint erős nukleofillel reagáltatjuk, a mezilát döntően S_N2 mechanizmus szerint, dimetil-amin hiányában viszont intramolekuláris aromás elektrofil szubsztitúcióban (S_{EAr}) alakul át. A hatóanyag szintézisekor a hőmérséklet emelkedés hatására a naftilgyűrű C2-es szénatomjának nukleofilitása verseng a dimetil-aminnal, mint erősebb nukleofillel. Ez a kompetíció befolyásolja a hatóanyag mellett megjelenő piránszármazék mennyiségét.

Az általunk leírt reakció további szintetikus kémiai felhasználhatósági lehetőségeit is tanulmányozhatjuk változatos szerkezetű, új szintetikus vegyületek előállítására.

5.2 A dapoxetin új bomlástermékei

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a Dpx-ből szabad levegőn tárolva Dpx-*N*-oxid keletkezik, amely spontán Cope eliminációs reakcióba lép, a megfelelő alkéneket (*E/Z*-CON) és dimetil-hidroxil-amin eredményezve (5. ábra).



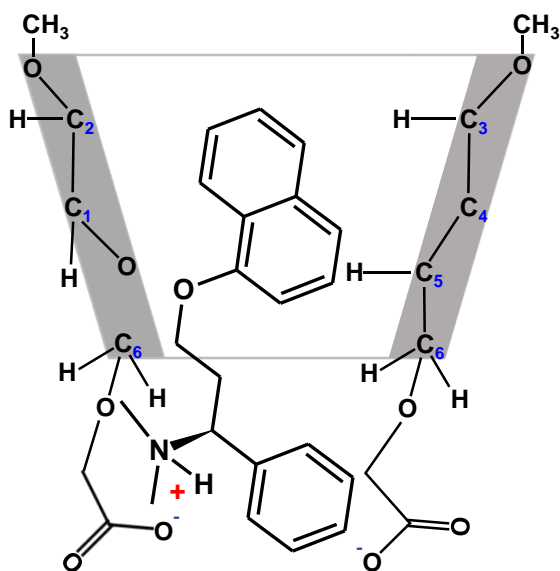
5. ábra. A Dpx bomlásának javasolt mechanizmusa, és a keletkező bomlástermékek szerkezete

Vizsgálataink alapján a Dpx humán metabolizmusának fő metabolitja a Dpx-*N*-oxid nagy valószínűséggel – Cope elimináción keresztül – fiziológiás körülmények között is bomolhat *E/Z*-CON és dimetil-hidroxil-amin képződésével.

5.3 A dapoxetin kölcsönhatása ciklodextrinekkal

Vizsgáltuk a dapoxetin komplexeit a natív β -, γ -CD-kel, a random szubsztituált RAME- γ -CD-nel és aktív metabolitjaival együtt egy új, izomertiszta per-karboximetil- γ -ciklodextrin (ODMCM- γ -CD) származékkal. A semleges dapoxetin oldhatóságát a β -CD hatszorosára, a γ -CD ötszörösére növelte, míg a RAME- γ -CD-nel több mint harmincszoros oldhatóságnövekedést sikerült elérnünk. A natív CD-kel képzett komplexek sztöchiometriáját és szerkezetét részletesen jellemeztük NMR és cirkuláris dikroizmus/UV spektroszkópiával. A zárványkomplexek között ritkának számító $2\text{Dpx} \cdot \text{CD}$ és $\text{Dpx} \cdot \text{CD}$ összetételű részecskék együttes jelenlétét mind az ^1H NMR titrálás során regisztrált kémiai eltolódás változások, a NOE mérések, CiD/UV adatok és a molekulamodellezés is egybehangzóan megerősítették. A komplexek stabilitási állandóit több, független technika segítségével határoztuk meg.

Az izomertiszta ODMCM- γ -CD-t, mint királis szelektort elsőként alkalmaztuk kapilláris elektroforézisben, a modellvegyületként alkalmazott racém Dpx és dezmetil-metabolitjainak enantiomerjeit sikeresen elválasztottuk. A Dpx ODMCM- γ -CD komplexről megállapítottuk, hogy pH-függő szerkezettel rendelkezik, melyben a gazdamolekula töltése irányítja a Dpx inklúzióját (6. ábra).



6. ábra. A Dpx/ODMCM- γ -CD komplex feltételezett szerkezete a 2D ROESY NMR mérések alapján, pH 7,0 értéken

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 Az értekezés alapját képző közlemények

1. **Darcsi A**, Rácz Á, Béni S. (2017) Identification and characterization of a new dapoxetine impurity by NMR: Transformation of *N*-oxide by Cope elimination. *J Pharm Biomed Anal*, 134: 187-194.
2. **Darcsi A**, Szakács Z, Zsila F, Tóth G, Rácz A, Béni S. (2016) NMR, CD and UV spectroscopic studies reveal uncommon binding modes of dapoxetine to native cyclodextrins. *RSC Adv*, 6: 102315-102328.
3. **Darcsi A**, Tóth G, Kökösi J, Béni S. (2014) Structure elucidation of a process-related impurity of dapoxetine. *J Pharm Biomed Anal*, 96: 272-277.
4. Benkovics G, Fejős I, **Darcsi A**, Varga E, Malanga M, Fenyvesi É, Sohajda T, Sente L, Béni S, Szemán J. (2016) Single-isomer carboxymethyl- γ -cyclodextrin as chiral resolving agent for capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1467: 445-453.

6.2 Az értekezés témaköréhez kapcsolódó saját közlemény

5. Neumajer G, Sohajda T, **Darcsi A**, Tóth G, Sente L, Noszál B, Béni S. (2012) Chiral recognition of dapoxetine enantiomers with methylated- γ -cyclodextrin: A validated capillary electrophoresis method. *J Pharm Biomed Anal*, 62: 42-47.

6.3 Más témákhoz kapcsolódó közlemények

6. Jankovics P, Lohner S, **Darcsi A**, Németh-Palotás J, Béni S. (2013) Detection and structure elucidation of hydroxythiovaridenafil as an adulterant in a herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal*, 74: 83-91.
7. Gampe N, **Darcsi A**, Lohner S, Béni S, Kursinszki L. (2016) Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny retharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. *J Pharm Biomed Anal*, 123: 74-81.
8. Benkovics G, Hodek O, Havlikova M, Bosakova Z, Coufal P, Malanga M, Fenyvesi É, **Darcsi A**, Béni S, Jindrich J. (2016) Supramolecular structures based on regioisomers of cinnamyl- α -cyclodextrins – new media for capillary separation techniques. *Beilstein J Org Chem*, 12: 97–109.

9. Fejős I, Varga E, Benkovics G, **Darcsi A**, Malanga M, Fenyvesi É, Sohajda T, Szenté L, Béni S. (2016) Comparative evaluation of the chiral recognition potential of single-isomer sulfated beta-cyclodextrin synthesis intermediates in non-aqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1467: 454-462.
10. Móricz Á, Ott P G, Häbe T T, **Darcsi A**, Böszörményi A, Alberti Á, Krüzselyi D, Csontos P, Béni S, Morlock G E. (2016) Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for *Solidago virgaurea*. *Anal Chem*, 88: 8202-8209.
11. Malanga M, **Darcsi A**, Bálint M, Benkovics G, Sohajda T, Béni S. (2016) New synthetic strategies for xanthene-dye-appended cyclodextrins. *Beilstein J Org Chem*, 12: 537-548.
12. Könye R, Ress Á E, Sólyomváry A, Tóth G, **Darcsi A**, Komjáti B, Horváth P, Noszál B, Molnár-Perl I, Béni S, Boldizsár I. (2016) Enzyme-hydrolyzed fruit of *Jurinea mollis*: a Rich source of (-)-(8R, 8'R)-Arctigenin. *Nat Prod Commun* 11: 1459-1462.